

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/18630 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

[DE/DE]; Rathenaustrasse 22, 16341 Schwanebeck (DE).
SCHLAG, Peter, Michael [DE/DE]; Frohnauer Strasse
17a, 13467 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE01/03323**

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. September 2001 (03.09.2001)

(74) Anwalt: **BAUMBACH, Fritz**; Robert-Rössle-Strasse 10,
13125 Berlin (DE).

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(81) Bestimmungsstaat (*national*): **US**.

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 43 591.2 1. September 2000 (01.09.2000) **DE**

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US*): **MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKU-
LARE MEDIZIN** [DE/DE]; Robert-Rössle-Str. 10, 13125
Berlin (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **STEIN, Ulrike**

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD OF ESTABLISHING RESISTANCE PROFILES OF TISSUES AND CELL LINES**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ERFASSUNG VON RESISTENZ-PROFILIEN VON GEWEBEN UND ZELLINIEN**

(57) Abstract: The efficiency of the chemotherapy of malign diseases is limited by resistances vis-à-vis the cytostatics used, which resistances are mediated by a plurality of different mechanisms that proceed at the same time or sequentially. The invention relates to the use of a method of establishing resistance profiles using RNA from tissues or cell lines by way of real-time RT PCR technology (carried out, for example, on the "Light Cycler" of Roche Diagnostics GmbH). The invention allows a quantitative analysis of the expressions of different genes that are associated with the development or the intensification or the reduction of resistances. Based thereon it is, for example, possible to establish individual patient resistance profiles that form the molecular-biological base for the selection of appropriate cytostatics before and also during the particular tumor chemotherapy. The inventive method also allows a prognosis of the chances of success (response) of certain chemotherapeutical regimes.

(57) Zusammenfassung: Die Effizienz einer Chemotherapie maligner Erkrankungen ist oft durch Resistenzen gegenüber der eingesetzten Zytostatika limitiert, die durch eine Vielzahl unterschiedlicher, parallel oder sequentiell auftretender Mechanismen vermittelt werden. Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Verfahrens zur Erfassung von Resistenz-Profilen mittels RNA aus Geweben bzw. Zelllinien mit der real time-RT-PCR-Technologie (durchführbar z.B. am Light Cycler, Roche Diagnostics GmbH). Es können so die Expressionen unterschiedlicher Gene, die an der Entstehung oder Verstärkung oder Verminderung von Resistenzen beteiligt sind, quantitativ nachgewiesen werden. Basierend darauf können dann z.B. Patienten-individuelle Resistenz-Profile erstellt werden, die die molekularbiologische Grundlage zur Auswahl geeigneter Zytostatika vor und auch während der jeweiligen Tumorchemotherapie bilden. Darüber hinaus können prognostisch die Erfolgchancen (Response) bestimmter chemotherapeutischer Regime abgeschätzt werden.

WO 02/18630 A2

Verfahren zur Erfassung von Resistenz-Profilen von Geweben und Zelllinien

Gegenstand der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Erfassung von Chemotherapie-Resistenz-Profilen in humanem Tumorgewebe bzw. Tumorzelllinien unter Verwendung der real time-PCR-Technologie (durchführbar z.B. am Light Cycler, Roche Diagnostics GmbH). Diese Patienten-individuelle Resistenzprofile werden aufgrund quantitativ ermittelter Expressionen Resistenz-relevanter Gene erstellt. Sie können dann die molekularbiologische Rationale zur Auswahl geeigneter Zytostatika in der jeweiligen Tumorchemotherapie bilden. Darüber hinaus können prognostisch die Erfolgschancen (Response) bestimmter chemotherapeutischer Regime abgeschätzt werden.

Wissenschaftlicher Hintergrund

Die Effizienz einer Chemotherapie maligner Erkrankungen ist oft durch Resistenzen gegenüber den eingesetzten Zytostatika limitiert, die durch eine Vielzahl unterschiedlicher, parallel oder sequentiell auftretender Mechanismen vermittelt werden.

1. Der in diesem Kontext bedeutendste Mechanismus besteht in der simultanen Resistenz gegenüber strukturell und funktionell nicht verwandten zytotoxischen Verbindungen. Dieses als Arzneimittel-Vielfachresistenz (Multidrug Resistenz MDR) bezeichnete Phänomen wird durch die Expression von MDR-assoziierten Genen verursacht. Hier stehen insbesondere die Gene, die für die ATP-abhängigen transmembranen Drug-Efflux-Pumpen kodieren (ABC-Transporter), im Mittelpunkt des Interesses. Durch Überexpression und Funktion dieser ABC-Transporter werden die intrazellulären Konzentrationen MDR-assoziiierter Zytostatika gering gehalten, die Zelle wird nicht/wenig beeinträchtigt und ist resistent. Zu diesen MDR-assoziierten Genen zählen die folgenden, für ABC-Transporter kodierende Gene: das MDR1-Gen (kodiert für P-Glykoprotein), die Gene MRP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (kodieren für die Multidrug Resistenz Proteine 1 bis 7), sowie das Gen BCRP/MXR/ABCP (kodiert für

ein identisches Protein; unterschiedliche Nomenklatur aufgrund zeitgleicher Entdeckung durch 3 unterschiedliche Gruppen). Das hauptsächliche Zytostatika-Spektrum dieser Transporter umfasst Anthrazykline wie Doxorubicin und Daunorubicin, Vinca Alkaloide wie Vincristin und Vinblastin, Epipodophyllotoxine wie Etoposide, Taxane wie Taxol, und Mitoxantron, aber auch den Transport von z.B. Nukleosiden.

2. Ein weiterer, MDR-assoziiierter Mechanismus besteht in der subzellulären Redistribution von Substanzen, z.B. im nukleozytoplasmatischen Transport. Der Hauptbestandteil der entsprechenden Zellorganelle (Vault) ist das Lung Resistance Protein/Major Vault Protein LRP/MVP.

3. Weitere, Resistenz-verursachende Gene kodieren für zytoplasmatische Proteine, die in den Metabolismus oder Detoxifikation von Zytostatika involviert sind: So verursachen z.B. die Enzyme Glutathion-S-Transferase (GST) und Aldehyd-Dehydrogenase (ADH) über intracelluläre Detoxifikation Cyclophosphamid-Resistenzen. Weitere Zytostatika-Resistenzen werden z.B. über die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR; gegen Methotrexat), über die Thymidylate-Synthase (gegen 5-Fluorodesoxyuridin) oder über Tubilin (gegen Vinca Alkaloide und Taxol) vermittelt.

4. Auch nukleäre Genprodukte können Zytostatika-Resistenzen verursachen. So sind z.B. die Enzyme Topoisomerase I (Resistenz gegen Camptothecin) und II (gegen Doxorubicin und Etoposid) in die Reparatur Zytostatika-induzierter DNA-Schäden involviert, ebenso wie Methyltransferase (MGMT) und Methylpurin-Glykosylase (MPG; beide Resistenz gegen alkylierende Agenzien). Das Enzym Superoxid-Dismutase (MnSOD, Resistenz z.B. gegen Anthrazykline) schützt vor oxidativen DNA-Schäden. In diese Gruppe Resistenz-verursachender, nukleärer Genprodukte zählen ebenso die „DNA-mismatch repair“-Gene, wie z.B. MLH1, MSH2 und MSH6, sowie PMS1 und PMS2.

5. Darüber hinaus zählen auch Apoptose-regulierende Gene (z.B. Bcl-2, Bax) sowie Zellzyklus-involvierte Gene (z.B. p53, MDM2) zu denen, die an der Entstehung bzw. Steigerung von Zytostatika-Resistenzen zumindest beteiligt sind.

Verfahren

Zur Nachweis der Expression aller dieser Gene können Standard-Techniken wie z.B. die Northern Blotting-Methode eingesetzt werden. Allerdings können über derartige Techniken keine quantitativen Aussagen zur jeweiligen Expressionshöhe gemacht werden. PCR-basierende Verfahren wie z.B. die MIMIC-PCR ist als eine sehr aufwendige und semi-quantitative PCR-Variane nicht geeignet, Expressionen eines Panels von Genen an einer Vielzahl von Geweben zu untersuchen. Ebenfalls schwierig gestaltet sich die densitometrische Auswertung von PCR-produkten nach gelelektrophoretischer Trennung. Deshalb soll hier zur Quantifizierung der Genexpression die Methode der real time RT-PCR zum Einsatz kommen, die z.B. am Light Cycler (Roche Diagnostics GmbH) durchführbar ist.

Im Folgenden wird die Methodik zur Analyse von humanem Tumormaterial beschrieben. Von den unmittelbar im OP schock-gefrorenen Biopsien bzw. Resektaten werden Kryoschnitte zur Expressionsanalyse angefertigt. Da generell die Methode der Mikrodissektion zum Einsatz kommt, werden die Kryoschnitte von jedem Gewebe durch einen Pathologen befundet, um zielgerichtet Tumorzellpopulationen bzw. Normalgewebe zu mikrodissizieren. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil der Vergleichbarkeit der nachfolgenden Expressionsanalysen von definiertem malignen Gewebe und Normalgewebe (z.B. beide Zellareale vom selben Schnitt). Aus diesen mikrodissizierten Geweben wird dann die totale zelluläre RNA isoliert. Die Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene wird unter Verwendung des Light Cycler Systems mit der real time RT-PCR und 50 ng totaler zellulärer RNA nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Amplifikate können entweder durch die Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green) detektiert werden, oder durch Verwendung von Fluoreszenz-markierten Oligos, die zwischen den Primern hybridisieren, sequenz-spezifisch nachgewiesen werden. Die Quantifizierung erfolgt über Gen-spezifische Transkripte, die in seriellen Verdünnungsreihen (meist 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5) mitgeführt wurden. Die Herstellung dieser Transkripte erfolgte über Klonierungsarbeiten der entsprechenden Gen-spezifischen cDNA bzw. Fragmente davon in spezielle Plasmide (z.B. mit SP6-, T3- oder T7-Promotoren für die entsprechenden DNA-abhängigen RNA-Polymerasen). Die Qualitätskontrolle der erhaltenen PCR-Fragmente vs. Primer-

Dimeren erfolgt über Schmelzpunktanalytik. Die visuelle Kontrolle kann mit herkömmlicher Gelelektrophorese durchgeführt werden.

Für die Evaluation der Expressionshöhen der MDR-Gene in den Tumoren werden sogenannte Kontroll-Zelllinien mitgeführt. Diese humanen Zelllinien sind jeweils als parentale Linien sowie als chemoresistente Varianten vorhanden. Überexpressionen z.B. bestimmter Resistenzgene werden auf beiden Expressionsebenen charakterisiert: auf RNA-Ebene mittels real time RT-PCR, und auf Proteinebene mittels FACScan-Analyse mit monoklonalen Antikörpern. Darüber hinaus werden funktionelle Parameter erfaßt, wie z.B. im Adriamycin-Akkumulations-Assay und im Rhodamin-Influx/Efflux-Assay. Diese Charakterisierungen bilden die Grundlage zur Evaluation der Genexpressionen in humanen Geweben oder Zelllinien, da in jeder RT-PCR-Lauf RNA des entsprechenden Zelllinienpaares als Positivkontrolle mitgeführt wird.

Die Anwendung der real time RT-PCR-Technologie wird bereits in der onkologischen Literatur z.B. zum quantitativen Nachweis des Onkogens MET als Marker von Tumorzellen in Lymphknotenmetastasen (G. Cortesina et al., Int. J. Cancer 89: 286-292, 2000) oder zum Nachweis einer *minimal residual disease* beim Mammakarzinom (M. Giesing et al., Int. J. Biol. Markers 15: 94-99, 2000), bei Lymphomen (J.G. Sharp et al., Cancer Metastasis Rev. 18: 127-142, 1999), bei akuter myeloischer Leukämie (T. Sugimoto et al., Am. J. Hematol. 64: 101-106, 2000) oder bei chronischer myeloischer Leukämie (M. Emig et al., Clin. Cancer Res. 13: 1825-1832, 1999) beschrieben. Für die Thematik der Chemotherapie-Resistenz ist diese Technik bisher nicht eingesetzt worden.

Anwendungsbeispiel

Unter Anwendung der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden bereits Expressionsanalysen Resistenz-assoziiierter Gene an humanen Tumoren wie Sarkomen und Melanomen (MDR1, MRP1, LRP) sowie an humanen Tumorzelllinien wie Kolonkarzinom- und Magenkarzinomlinien (MDR1, MRP1, LRP, BCRP) durchgeführt. Im Folgenden sind einige Beispiele für die Expression des LRP-Gens in humanen Sarkomen sowie dem korrespondierenden Normalgewebe dargestellt (Abb.1):

Legende zu Abbildung 1

Abbildung 1

Exemplarisch ausgewählte Resistenz-Profile von Leiomyosarkom-Patienten #1 - #3, erstellt mittels quantitativer real time RT-PCR. Die Expressionsanalytik erfolgte an Geweben, die an den fettgedruckten Behandlungszeitpunkten erhalten wurden. S=Chirurgie, C=Chemotherapie, H=Hyperthermie, R=Radiotherapie, ci=Cisplatin, cy=CYVADIC, d=Dacarbacin, e=Epirubicin, i=Ifosphamid, t=TNF, me=Melphalan,

Patentansprüche

1. Verwendung eines Verfahrens zur Erfassung von Resistenz-Profilen in Geweben oder Zelllinien, dadurch gekennzeichnet, dass es quantitativ die RNA-Expression von definierten Genen

- a) mittels Interkalierung eines Fluoreszenz-Farbstoffes (z.B. SYBR-Green), oder
- b) mittels Verwendung sog. Taqman-Sonden (ist am 5'- und 3'-Ende markiert), oder
- c) mittels HybProbes (2 jeweils am 3'- bzw. am 5'-Ende markierte Hybridisierungssonden),
- d) singular (die Expression eines Genes wird in einer Probe in einem Lauf detektiert), oder
- e) multiplex (die Expression von mehreren Genen wird simultan in einer Probe in einem Lauf detektiert) erfasst.

2. Verwendung nach Anspruch 1., dadurch gekennzeichnet, dass die RNA

- a) aus humanen Geweben wie Normalgewebe oder Tumorgewebe,
- b) aus Geweben von in vivo-Modellen,
- c) aus Zelllinien isoliert wird.

3. Verwendung nach Ansprüchen 1. und 2., dadurch gekennzeichnet, dass Gen-spezifische Primer bzw. Primer und Sonden für die Expressionsanalyse von Genen eingesetzt werden, die am Prozess der Entstehung/Verstärkung/Verminderung von Resistenzen beteiligt sind, wie

- a) Gene für transmembrane ABC-Transporter wie MDR1, MRP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, BCRP/MXR/ABCP,
- b) Gene für den nukleozytoplasmatischen Transport wie LRP/MVP,
- c) Gene für zytoplasmatische Enzyme wie GST, ADH, DHFR, Thymidylate-Synthase, oder Tubulin,
- d) Gene für nukleäre Proteine wie Topoisomerase I und II, MGMT, MPG, MnSOD, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 und PMS2,
- e) Gene für Apoptose- bzw. Zellzyklus-involvierte Proteine wie Bcl-2, Bax, p53, MDM2.

4. Verwendung nach den Ansprüchen 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass das Expressionsprofil

- a) den intrinsischen Expressionsstatus nachweist, und/oder
- b) den Expressionsstatus nach Beeinflussung durch externe Faktoren wie z.B. bei einer Tumorthherapie nachweist und damit die Erfassung potentiell Therapiebedingter Genmodulationen erlaubt.

5. Verwendung nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) die Auswahl der Zytostatika vor einer Tumorchemotherapie aufgrund des individuellen, intrinsischen Resistenz-Profils erfolgt,
- b) die Auswahl der Zytostatika während einer Tumorchemotherapie aufgrund des individuellen, jedoch modulierten Resistenz-Profils erfolgt und
- c) prognostisch die Erfolgchancen (Response) bestimmter chemotherapeutischer Regime abgeschätzt werden.

Abbildung 1

